

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 547.962, 577.151.34

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОНОКЛИННОЙ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. В. Соколов¹, В. Б. Васильев¹, В. Р. Самыгина^{2,3,*}

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: lera@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 03.06.2022 г.

Впервые получены кристаллы церулоплазмина (ЦП) человека, принадлежащие пр. гр. *I2*. Новая кристаллическая упаковка позволила впервые определить конформацию лабильной функциональной петли 884–890 между пятым и шестым доменом. Проведено сравнение моноклинной и тригональной кристаллических упаковок ЦП. Полученная в работе структура подтверждает эффективность метода очистки белка, позволяющего получить непротеолизированный ЦП, а также высказанное ранее предположение о значении целостности петли 884–892 для ингибирования миелопероксидазы нейтрофилов при образовании комплекса с ЦП.

DOI: 10.31857/S0023476122060236

ВВЕДЕНИЕ

Церулоплазмин (ЦП, ферро:O₂-оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) является полифункциональной медьсодержащей оксидазой. Важное физиологическое значение имеет ферроксидазная активность ЦП. Фермент катализирует окисление иона Fe²⁺ до Fe³⁺ и обеспечивает встраивание Fe³⁺ в апо-трансферрины, участвуя таким образом в метаболизме железа [1]. ЦП окисляет четыре иона Fe²⁺ и осуществляет четырехэлектронный перенос на кислород с образованием воды, препятствуя неферментативной реакции окисления железа, ведущей к появлению свободных радикалов, что делает его природным антиоксидантом. ЦП обладает также активностью супероксиддисмутазы [2] и глутатион-зависимой пероксидазы [3]. ЦП образует комплексы с белками лейкоцитов: пероксидазой эозинофилов, лактоферрином, прооксидантным ферментом нейтрофилов и моноцитов – миелопероксидазой (МПО). ЦП относят к физиологическим ингибиторам МПО [4]. ЦП также подавляет активность фактора ингибирования миграции макрофагов благодаря контактам вблизи активного центра при их взаимодействии [5].

Кристаллическая структура ЦП впервые была решена в 1996 г. с разрешением 3.1 Å [6]. ЦП представляет собой мономер, а при повышенной кон-

центрации ионов меди ЦП может образовывать димеры [7]. Мономер состоит из шести доменов, с которыми неравномерно, но прочно связаны шесть ионов меди. Во втором, четвертом и шестом доменах расположены гомологичные одноядерные центры связывания меди, трехъядерный центр расположен между первым и шестым доменами. Кроме этого, были обнаружены еще два лабильных сайта связывания металлов, из которых в нативном ЦП заселена лишь половина [8]. По гипотезе, высказанной в [9], эти сайты играют важную роль в окислении железа. Банк белковых данных (Protein Data Bank, PDB) содержит три структуры ЦП человека, относящиеся к тригональной сингонии (*P3₂21*) с разрешением от 3.1 до 2.6 Å [6, 9, 10]. В 2008 г. была получена орторомбическая пространственная группа в условиях кристаллизации, аналогичных тем, что позволяли получить кристаллы тригональной сингонии [11]. Влияние на кристаллическую упаковку, вероятно, оказали ионы Ni²⁺, использовавшиеся при выделении белка и связавшиеся в лабильных центрах связывания ионов меди. Позднее была продемонстрирована зависимость кристаллической упаковки ЦП крысы (имеющего высокую гомологию с ЦП человека) от кристаллизационных условий [12].

Чувствительность ЦП к протеолитической деградации затрудняет получение кристаллов высо-

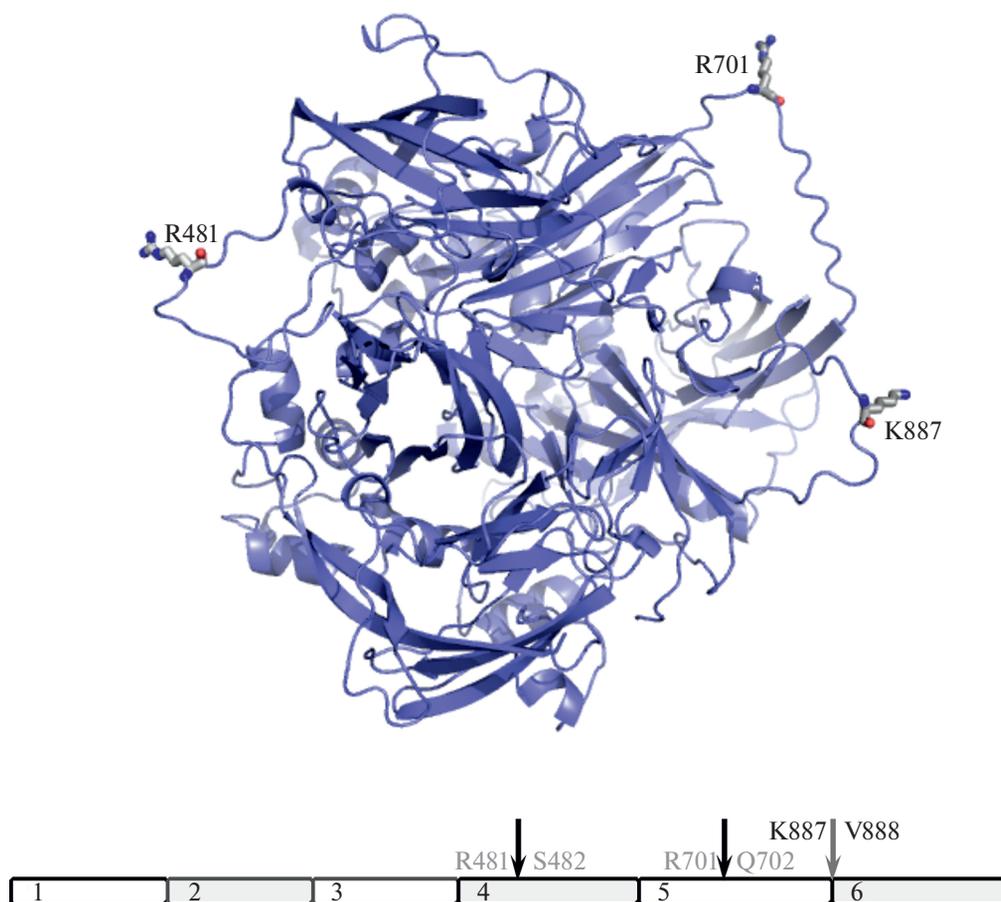


Рис. 1. Общая структура ЦП. Аминокислотные остатки, относящиеся к консервативным сайтам протеолиза, показаны стиками (верхняя панель – петля, содержащая R481, смоделирована) и обозначены стрелками на схеме доменной структуры ЦП.

кого дифракционного качества. В известных кристаллических структурах ЦП человека отсутствует электронная плотность для двух из трех междоменных петель, содержащих консервативные сайты протеолиза, одна из которых соответствует участку а.о. 885–890. Выделение недеградированного и стабильного ЦП остается непростой задачей. В препаратах ЦП присутствуют примеси протеиназ [13–15], что делает необходимым использование смеси протеиназных ингибиторов на всех стадиях выделения ЦП [16].

Существуют три консервативных сайта протеолиза ЦП: R481/S482, R701/Q702, K887/V888 [13] (рис. 1). Согласно [17] замена этих аминокислотных остатков в рекомбинантном ЦП с помощью сайт-направленного мутагенеза позволяет получить белок, устойчивый к протеолизу. Отсутствие протеолитической деградации по K887 важно для ингибирования церулоплазмином белка нейтрофилов МПО при образовании комплекса [10].

В настоящей работе получена новая, моноклинная кристаллическая модификация ЦП и

описаны ее особенности. Обсуждается конформация функциональной петли 885–890 между пятым и шестым доменами, пространственная структура которой установлена впервые благодаря использованию для кристаллизации недеградированного ЦП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка ЦП. Для получения препарата мономерного ЦП с $A_{610}/A_{280} > 0.049$ плазму крови с добавлением 1 мМ этилендиамина тетрауксусной кислоты и 0.1 мМ фенолметилсульфонилфторида подвергали анионообменной хроматографии на UNOsphere Q и неомидин-агарозе [18]. Для гарантированного удаления следов тромбина препарат ЦП фильтровали через колонку с бензамидин-агарозой. ЦП концентрировали до 80 мг/мл с помощью центрифужной ячейки Vivaspin 20 (для $M > 100$ кДа), трижды заменяя буферный раствор (0.1 М Hepes-NaOH, pH 7.5).

Кристаллизация и сбор дифракционных данных. Кристаллы ЦП получали при 4°C методом диф-

фузии паров. Кристаллизационный раствор содержал 3–7% PEG 3350, 20 mM MgCl₂ и 50 mM Tris-буфера, pH 7.5. Кристаллы голубого цвета в виде тонких пластин размером 0.08–0.2 мм появлялись через 3–5 дней. В качестве криопротектора использовали 20% глицерина. Сбор дифракционных данных проводили на станции синхротронного излучения BL41XU, SPring-8 (Япония) при температуре 100 К с использованием детектора PILATUS 6M. Для обработки данных использовали программы DENZO, SCALEPACK [19]. Характеристики дифракционного набора приведены в табл. 1.

Решение и уточнение структуры. Структура решена методом молекулярного замещения с использованием программы MOLREP [20]. В качестве начальной модели использовали структуру ЦП (ID PDB: 4ENZ), решенную с разрешением 2.6 Å [10]. Уточнение выполнено с использованием программы REFMAC [21] и графической программы COOT [22]. Финальный *R*-фактор/*R*_{free}-фактор составил 21.49/32.6%. Согласно карте Рамачандрана в наиболее благоприятных областях находятся 86.6/87.1% аминокислотных остатков (а.о.), в дополнительно разрешенных – 12.8/12.2%, в основных – 0.5/0.6%, в запрещенных – лишь 0.1/0.1% а.о. Характеристики решенной и уточненной пространственной структуры приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Найдены новые кристаллизационные условия для ЦП, в которых белок впервые был закристаллизован в пр. гр. *I*2. Коэффициент Мэтьюса для моноклинной кристаллической упаковки составляет 2.59 Å³/Да, что соответствует содержанию растворителя 52.57%. Для сравнения содержание растворителя для тригональной упаковке составляет ~70% при коэффициенте Мэтьюса 4.23 [11].

Обычно меньшее содержание растворителя в кристаллической ячейке позволяет получить лучшее разрешение дифракционных данных от кристалла белка [23]. Наиболее высокое пространственное разрешение было получено для орторомбической формы ЦП крысы с содержанием растворителя в кристаллической ячейке 51.71% (коэффициент Мэтьюса 2.55 Å³/Да). Несмотря на сходное значение коэффициента Мэтьюса разрешение структуры моноклинной формы ЦП челоуека значительно хуже. Однако в данном случае, вероятно, сыграли роль меньший размер кристалла и его форма в виде тонкой пластины. Также кристалл обладал высокой мозаичностью, составлявшей 1.54°.

В кристалле имеются каналы вдоль короткой оси диаметром ~30 Å и извилистые каналы с полостями диаметром ~40 Å вдоль оси *a*. Они уже

Таблица 1. Характеристики экспериментального набора дифракционных данных и уточнения структуры церулоплазмينا

Параметры экспериментального набора дифракционных данных	
Длина волны, Å	1.0000
Пространственная группа	<i>I</i> 2
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å	128.35, 76.22, 148.0
$\alpha = \gamma$, β , град	90.00, 108.98
Диапазон разрешения при сборе данных, Å	50.0–3.5 (3.83–3.5)*
Полное число отражений	80067 (12395)*
Число независимых отражений	27923 (4456)*
Полнота набора, %	95.6 (96.1)*
Повторяемость	2.9 (2.9)*
Среднее значение $\langle I/\sigma(I) \rangle$	3.3 (1.2)*
Общий температурный фактор Вильсона, Å ²	86.9
<i>R</i> _{merge}	5.56 (82.41)*
<i>R</i> _{pim}	3.16 (46.72)*
<i>CC</i> _{1/2} ^{**} , %	91.4 (67.2)*
Параметры уточнения структуры	
Число рефлексов в рабочем наборе	15452 (1134)
Число рефлексов в тестовом наборе	789
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} , %	21.49/32.26
Cruickshank DPI, Å	0.73
Число уточняемых неводородных атомов	
Белка	8359
Лигандов	54
Воды	–
R.m.s.d. от “идеальной” геометрии	
По длинам валентных связей, Å	0.014
По валентным углам, град	2.715
Среднее значение <i>B</i> -фактора для всех атомов, Å ²	69.74
Статистика Рамачандрана	
Число а. о. в наиболее благоприятных областях, %	98.79
Число а. о. в разрешенных областях, %	0.81
Число а. о. в неблагоприятных областях, %	0.4
Число редко встречающихся ротамеров, %	0.73

* В скобках приведены значения для зоны высокого разрешения.

** *CC*_{1/2} – коэффициент корреляции Пирсона между двумя случайно выбранными группами измеренных интенсивностей отражений, составляющих по половине от всего набора.

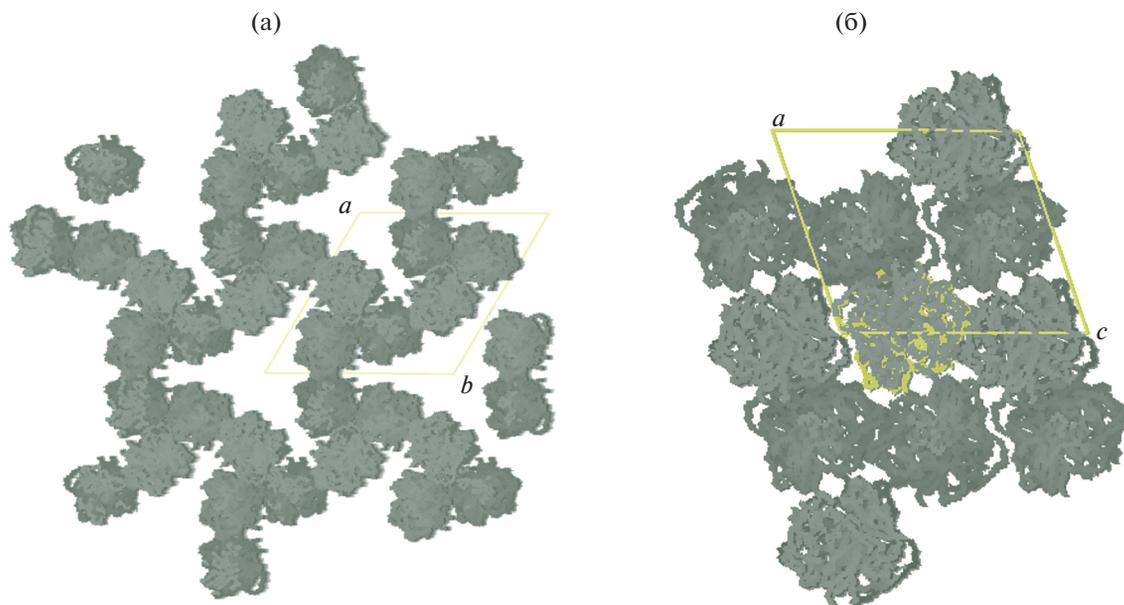


Рис. 2. Кристаллические упаковки ЦП: а – тригональная, б – моноклинная.

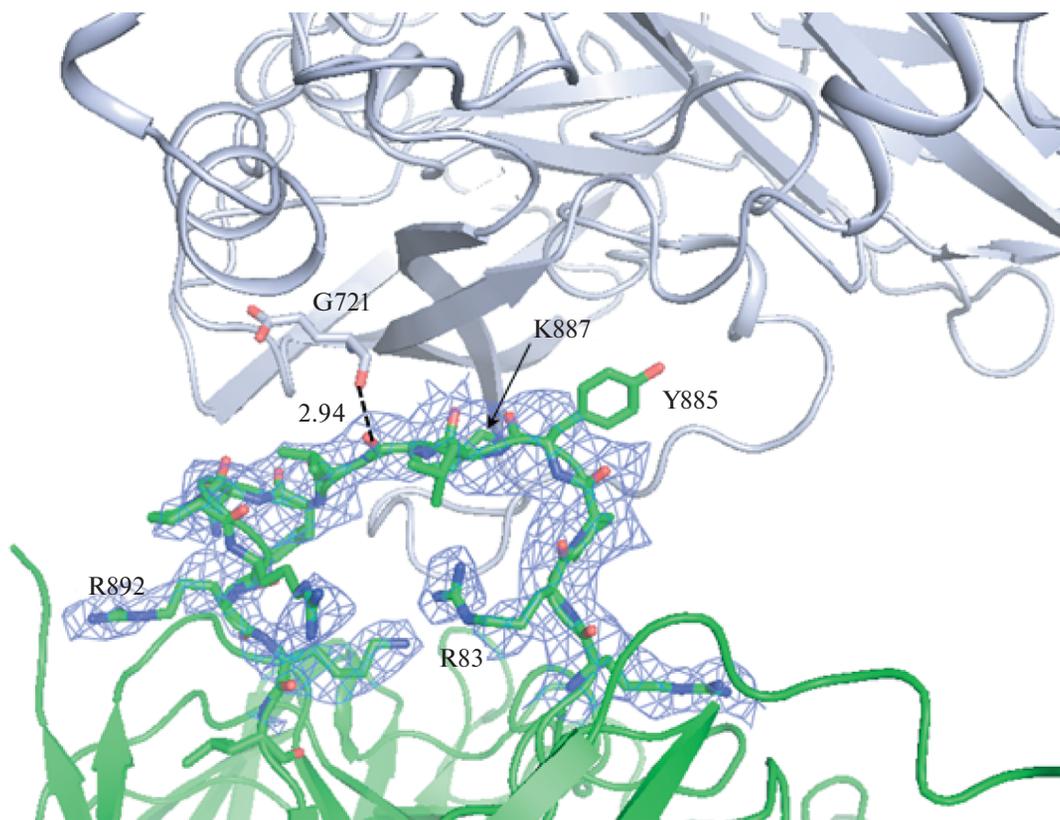


Рис. 3. Фрагмент карты электронной плотности 2Fo-Fc для петли 884–892. Уровень срезки 1σ. Светлым показана структура симметричной молекулы.

каналов тригональной кристаллической упаковки, которые по форме напоминают треугольник и имеют сечение $\sim 110 \times 110 \times 110 \text{ \AA}$ (рис. 2).

Благодаря упаковке молекул в кристалле подвижная петля между пятым и шестым доменами,

содержащая сайт протеолиза, находится вблизи симметричной молекулы (рис. 3). Впервые в истории структурных исследований ЦП, несмотря на невысокое разрешение, для этой петли присутствует электронная плотность, позволяющая

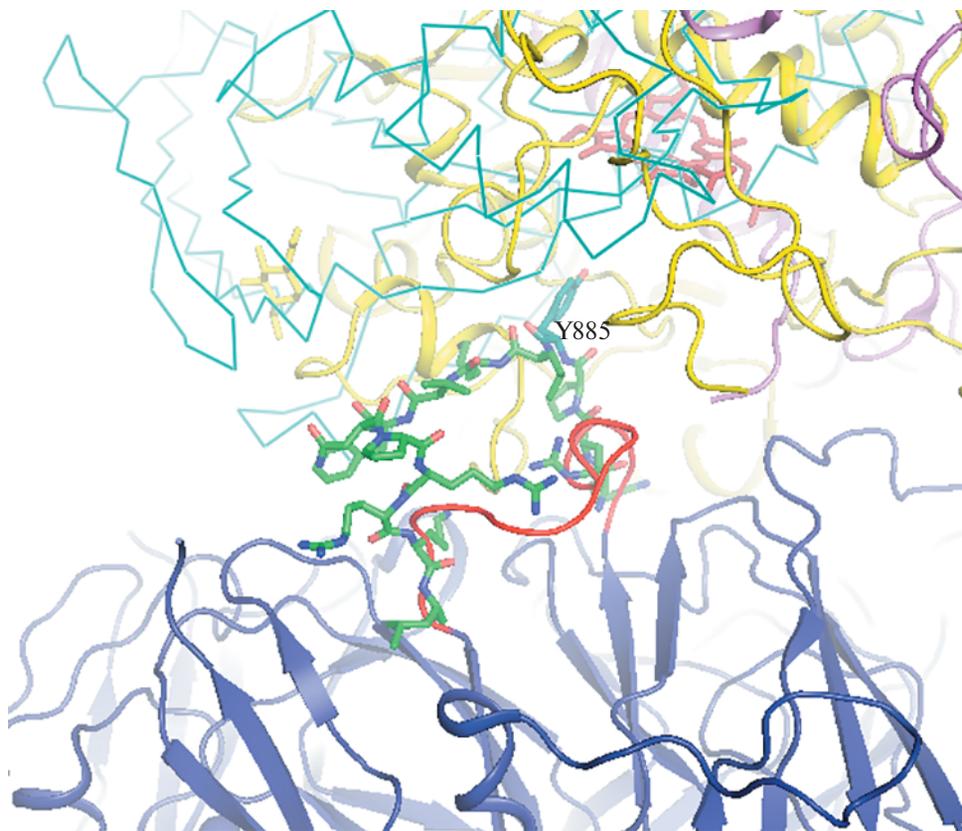


Рис. 4. Сравнение конформаций петли 882–894 в ЦП (пр. гр. *I2*) (показана стиками: атомы углерода показаны зеленым, кислорода – красным, азота – синим) и в комплексе ЦП–МПО (красный). Структуры наложены по $\text{C}\alpha$ -атомам ЦП. Для наглядности ЦП моноклинной формы не показан, за исключением петли 882–894. Y885 показан темно-голубым, ЦП комплекса ЦП–МПО – синим. Тяжелая цепь МПО изображена желтым, легкая – розовым. Симметричная молекула ЦП моноклинной кристаллической упаковки показана темно-зеленым (ход полипептидной цепи). Гем МПО показан темно-оранжевым.

определить позиции $\text{C}\alpha$ -атомов участка 884–892. Несмотря на отсутствие близких контактов с симметричной молекулой, атом O Lys 887 находится на расстоянии 2.94 Å от атома O 721 Gly симметричной молекулы, что может указывать на то, что эти атомы образуют водородную связь. Учитывая, что именно пептидная связь 887 лизина является сайтом протеолиза, это взаимодействие имеет, по-видимому, важное значение для стабилизации конформации петли. Также это еще раз подтверждает, что протокол, разработанный в [18], позволяет получать недеградированный ЦП. Исследования комплекса ЦП с МПО показали, что протеолизированный ЦП образует комплекс, но не ингибирует хлорирующую активность МПО [10]. Структура комплекса ЦП с МПО определена методами малоуглового рентгеновского рассеяния в растворе и рентгеноструктурного анализа с низким разрешением, не позволяющим увидеть тонкие детали структуры. В структуре также не наблюдалось электронной плотности для атомов а. о. петли 884–892, ее конформация была смоделирована [10]. Пространственное совмещение

структуры молекулы ЦП, полученной в настоящей работе, и ЦП в кристаллической структуре комплекса ЦП с МПО показало, что позиция симметричной молекулы ЦП в моноклинной сингонии сходна с позицией мономера МПО (рис. 4). Конформация петли в моноклинном ЦП естественно не может точно соответствовать конформации этой петли в комплексе. Однако она расположена близко от входа в гемовый карман МПО. Можно с осторожностью предположить, что боковая цепь Tyr885, обращенная в сторону гемового кармана МПО, может участвовать в контакте ЦП с МПО и ингибировании миелопероксидазы церулоплазмином.

Работа выполнена в рамках Федеральной космической программы 2016–2025 гг. (ОКР “МКС (Наука)”) в части сбора набора дифракционных данных и программы деятельности НИЦ Курчатовский Институт (приказ № 2756 от 28.10.2021 г.) в части кристаллизации, решения, уточнения и анализа структуры белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hellman N.E., Gitlin J.D.* // *Annu Rev. Nutr.* 2002. V. 22. P. 439.
2. *Plonka A., Metodiewa D., Zgirski A. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980. V. 95. P. 978.
3. *Kim I.G., Park S.Y.* // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 293.
4. *Segelmark M., Persson B., Hellmark T., Wieslander J.* // *Clin. Exp. Immunol.* 1997. V. 108. P. 167.
5. *Соколов А.В., Дадинова Л.А., Петухов М.В. и др.* // *Биохимия.* 2018. Т. 83. № 6. С. 895.
6. *Zaitseva I., Zaitsev V., Card G. et al.* // *J. Biol. Inorg. Chem.* 1996. V. 1. P. 15.
7. *Petoukhov M.V., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Samygina V.R.* // *Cryst. Rep.* 2021. V. 5. P. 828.
<https://doi.org/10.1134/S1063774521050175>
8. *Lindley P.F., Card G., Zaitseva I. et al.* // *J. Biol. Inorg. Chem.* 1997. V. 2. P. 454.
9. *Bento I., Peixoto C., Zaitsev V.N., Lindley P.F.* // *Acta Cryst. D.* 2007. V. 63. P. 240.
<https://doi.org/10.1107/S090744490604947X>
10. *Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G. et al.* // *PlosOne.* 2013. V. 8. e67145.
11. *Самыгина В.Р., Соколов А.В., Пулина М.О. и др.* // *Кристаллография.* 2008. Т. 53. С. 690.
12. *Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G. et al.* // *Metallomics.* 2017. V. 9. P. 1828.
<https://doi.org/10.1039/C7MT00157F>
13. *Noyer M., Dwulet F.E., Hao Y.L., Putnam F.W.* // *Anal. Biochem.* 1980. V. 102. P. 450.
14. *Bianchini A., Musci G., Calabrese L.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 20265.
15. *Ehrenwald E., Fox P.L.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. V. 309. P. 392.
16. *Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б.* // *Биоорган. химия.* 2005. Т. 31. С. 269.
17. *Bielli P., Belenchi G.C., Calabrese L.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 2678.
18. *Соколов А.В., Костевич В.А., Романико Д.Н. и др.* // *Биохимия.* 2012. Т. 77. С. 775.
19. *Otwinowski Z., Minor W.* // *Methods Enzymol.* 1997. V. 276. P. 307.
20. *Vagin A., Teplyakov A.* // *J. Appl. Cryst.* 1997. V. 30. P. 1022.
21. *Murshudov G.N., Vagin A.A., Lebedev A. et al.* // *Acta Cryst. D.* 1999. V. 55. P. 247.
22. *Emsley P., Cowtan K.* // *Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. P. 2126.
23. *Weichenberger Ch.X., Afonine P.V., Kantardjieff K., Rupp B.* // *Acta Cryst. D.* 2015. V. 71. P. 1023.